

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



09/890496

РСТУ 00100477

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ
(РОСПАТЕНТ)

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

рег.№ 20/12-912

"20" декабря 2000 г.

RU 001477

С П Р А В К А

4

REC'D 04 JAN 2001

WIPO

РСТ

агентства

Федеральный институт промышленной собственности Российского агентства по патентам и товарным знакам настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы и чертежей (если имеются) заявки на выдачу патента на изобретение № 99125349, поданной в декабре месяце восьмого дня 1999 года (08.12.99).

Название изобретения

Способ культивирования и модификации гетерогенных клеток млекопитающих

Заявитель

ЗЫБИН Дмитрий Владимирович
КОТЕЛЕВИЦ Алексей Геннадиевич
СЕВЕРИН Сергей Евгеньевич
СОЛОГУБ Владимир Константинович

Действительный автор(ы)

ЗЫБИН Дмитрий Владимирович
КОТЕЛЕВИЦ Алексей Геннадиевич
СЕВЕРИН Сергей Евгеньевич
СОЛОГУБ Владимир Константинович

Уполномоченный заверить копию
заявки на изобретение

Т.Ф. Владимира
И.О. заведующего отделом

СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И МОДИФИКАЦИИ
ГЕТЕРОГЕННЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А61К 35/12

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии и иммуноонкологии и касается проблемы вакцинации против опухолевых клеток и вакцинотерапии онкологических заболеваний.

Известно, что проблема трансплантации органов, тканей, клеточных культур млекопитающих сопряжена с трудностями связанными с «приживляемостью» чужеродных тканево-клеточных агентов в организме реципиента. Существующие способы пересадки алло-, гетеро-, ксенотрансплантантов требуют или мощной иммуносупрессивной терапии реципиента или оригинальных методик. К последним относятся способы трансплантации клеток различных органов плодов человека и животных, т.е. используется эффект несложившейся видовой специфичности. Таким образом проводят трансплантацию культур островковых клеток поджелудочной железы 24-26 недельных плодов человека в паренхиму печени или в воротную вену в эксперименте крысам.

Местом введения клеток может служить пульпа селезенки или мышцы передней брюшной стенки. Известны случаи лечения аналогичным методом людей, страдающих сахарным диабетом. (Скалецкий Н.М. «Влияние культивирования островковых клеток поджелудочной железы на их выживание в организме ксеногенного реципиента». Всесоюзная конференция по трансплантации органов 1995 г., стр. 219-220.)

Представляет интерес пересадка клеток Лейдига в тестикулярную ткань мужским особям для лечения бесплодия, так как реакция отторжения не наступает из-за наличия гематотестикулярного барьера. (Зыбин Д.В. «Способ лечения больных с нарушением мужской половой функции методом трансплантации». Патент РФ № 2026643 от 20.01.95.)

заселено 20.11.07

22.03.2000

сделано

В результате обоих описанных способов были получены хорошие результаты по сохранению жизнеспособности и активности трансплантируемых клеток. Но в первом случае определенным недостатком способа можно считать использование только эмбриональных клеток, а во втором - клеточной терапии подвергаются только мужские особи.

Известен способ вакцинации и вакцинотерапии опухолей с помощью живых клеток. Применяемые клетки являются гибридомами или трансфецированными клетками, аллогенными или аутогенными. Недостатками являются кратковременное существование клеток в организме и соответственно низкий иммунизирующий эффект. (B.E. Souberbielle, M. Westby, S. Ganz, J. Kayaga. Comparison of four strategies for tumor vaccination in the B-16 F10 melanoma model. Gene therapy 1998, 1447-1454.)

Наиболее близкими, предложенному способу, являются следующие способы:

Трансплантация ОКПЖ (островковых клеток поджелудочной железы) с использованием микрокапсулляции.

Способ состоит в введении ОКПЖ (алло- или ксеногенных), инкапсулированных в сферы альгинатного геля. Сфера имплантируют интраперитониально. Имплантация сфер полностью заменяет терапию инсулином на 175 дней, но при этом одновременно применяется иммуносупрессивная терапия. Крысам с индуцированным диабетом вводят бычью ОКПЖ без иммуносупрессии. Нормогликемия поддерживается от нескольких недель до месяца.

Недостатком способа является необходимость применения иммуносупрессивной терапии, кроме того определенные трудности представляют приготовление капсул *in vitro*. (Lanza R.P., Ecker D.M., Marsh J.P. Transplantation of islets using microencapsulation: studies in diabetic rodents and dogs. J.Mol.Med. 1999 Jan. 77(1): 206-10).

Известен способ вакцинации и вакцинотерапии опухолей с помощью живых клеток. Методика состоит в получении гибридом опухолевых клеток и аллогенных дендритных клеток (или макрофагов). Полученные гибридомы используют как вакцинныепре препараты.

Недостатком является невысокий иммунизирующий эффект, обусловленный кратковременным существованием введенных клеток в организм реципиента. (Gajewski T.F., Fallarino F. Rational development of tumor antigen-specific immunization in melanoma. Therapeutic Immunology, 1997, 2, 211-225).

Целью изобретения является обеспечение возможности длительного существования гетерогенных клеток в организме реципиента с модификацией некоторых из них, в частности опухолевых. Поставленная цель достигается путем предварительного введения млекопитающему поликариламидного геля, с последующей инъекцией в образовавшуюся капсулу гетерогенных клеток млекопитающих.

Сущность предложенного способа состоит в следующем. Соединительнотканная капсула формируется путем подкожного введения поликариламидного геля (ПААГ) крысам линии Wister в объеме 1,0 мл и мышам линии C57BLACK и BALB\С в объеме 0,5 мл. В эксперименте участвуют разнополые особи. В гель вводят клетки Лейдига половозрелых поросят и крыс. Контролем служат животные, которым вводят клетки под кожу. Суспензию жизнеспособных клеток Лейдига тестикул половозрелых поросят и крыс готовят, используя растворы, содержащие питательный субстрат для клеток, в частности составами стандартных сред Игла, среды 199, раствором Хэнкса и т.п.

Количество имплантируемых клеток составляет 5млн. кл в 1мл. В течение 7 месяцев берут пробы крови животных с целью определения тестостерона. Причем, в этой части эксперимента используют самок крыс /график 1/, что говорит о высокой активности внутрикапсуллярного

3 ассесмент

Д осн 22.03.20.

счет

трансплантата. После 7 месяцев наблюдения животных забивают и проводят гистологическое исследование, которое показывает наличие большого количества жизнеспособных клеток Лейдига, что позволяет сделать вывод о возможности жизнедеятельности ксено- и гетерогенных клеток в организме реципиента с использованием геля.

Следующие примеры иллюстрируют жизнедеятельность и иммуногенную активность опухолевых клеток *in vivo* в геле.

Пример 1: Опытной партии мышей линии BALB\С (в количестве 6 особей), подкожно вводят ПААГ в объеме 0,5 мл. В гель вводят клетки опухоли меланомы мыши В-16 в объеме 1 мл с концентрацией клеток 1 млн.

Контрольной группе мышам линии BALB\С (в количестве 6 особей) подкожно вводят клетки меланомы мыши В-16 в объеме 1 мл. с концентрацией клеток 1 млн.

Известно что, у мышей линии BALB\С меланома мышей В-16 не дают роста. В контрольной группе животных рост опухоли не обнаружен у всех 6 особей. В опытной группе животных, путем пальпаторного исследования, отмечен рост опухоли в ПААГ у всех 6 особей. На 60 день опытных животных с мышью меланомой В-16 в геле забивают. Гель с опухолевыми клетками извлекают в асептических условиях и переводят в монослойную культуру на питательной среде РПМИ-1640 с 10% фетальной сывороткой. Фрагменты капсулы с опухолевыми клетками фиксируют в нейтральном растворе формалина и проводят гистологическое исследование, которое позволяет судить о более высокой дифференциации меланомных клеток и потере ими пролиферативной активности (табл. 1 [1-2]).

Пример 2: Культуру клеток, полученную по примеру 1, в количестве 1 мл с концентрацией клеток 1 млн. вводят мышам линии C57 BLACK подкожно (количество особей 6).

*запись
2004 22.03.2000
секр*

Известно, что опухоль меланомы мышей B-16 у линии мышей C57 BLACK дает рост опухоли в 100% случаев, гибель животных наступает на 20-25 день в 100% случаев.

Контрольной группе мышей C57BLACK вводят культуру клеток меланомы мыши B-16 в количестве 1 мл с концентрацией клеток 1 млн.

У опытных мышей появление признаков роста опухоли отмечают через 30-33 дня, в контроле через 5-8 дней. Срок жизни опытных мышей составляет 60-65 дней, контрольных – 20-23 дня (табл. 2).

Пример 3: Мышам линии C57black (в количестве 6 особей) вводят ПААГ в объеме 0,5 мл подкожно. В гель вводят культуру клеток меланомы человека SKMEL28 в объеме 1 мл с концентрацией клеток 1 млн.

Контрольной группе мышей, той же линии, (в количестве 6 особей) вводят подкожно культуру клеток меланомы человека SKMEL28 в объеме 1 мл с концентрацией клеток 1 млн.

Известно что, культура клеток меланомы человека не дает роста у мышей в 100% случаев. В опытной группе животных в геле определяется пальпированием рост опухоли на 15-20 день после инъекции. У контрольных животных рост опухоли не отмечен (таблица 1 [3-4]).

Пример 4: Группе опытных животных (количество особей 6), описанных в примере 3, вводят культуру клеток меланомы мыши B-16 подкожно в объеме 1 мл с концентрацией клеток 1 млн. Контрольной группе мышей линии C57BLACK (количество особей 6) вводят подкожно культуру клеток меланомы мыши B-16 в объеме 1 мл с концентрацией клеток 1 млн.

У контрольных животных на 7-15 день развиваются подкожные меланомы в диаметре приблизительно 3-5 см.. В это же время у опытных мышей признаков опухоли не обнаружено (табл.3).

Вывод: таким образом, полученные результаты позволяют предложить способ культивирования гетерогенных клеток в ПААГ *in vivo*

Задание
докс 22. 03. 2000

в результате чего снижается пролиферативная активность опухолевых клеток и культивируемые клетки оказывают на организм иммунизирующее действие, что может быть использовано для вакцинации и вакцинотерапии.

Заменено 20.01.2000
авт

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ культивирования и модификации гетерогенных клеток млекопитающих, с последующим использованием их для получения вакцины препаратов, отличающийся тем, что культивирование гетерогенных клеток осуществляется в полиакриламидном геле длительное время в живом организме.

ТАБЛИЦА № 1. СРАВНЕНИЕ РОСТА МЕЛНОМЫ В-16 (МЫШЕЙ) И SKMEL 28 (ЧЕЛОВЕКА) В МЫШАХ ЛИНИЙ BALB\С И C57BLACK.

| № | ЛИНИЯ МЫШЕЙ | ШТАММ ОПУХОЛИ | РОСТ МЕЛНОМЫ | ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ | МЕТАСТАЗЫ |
|---|---------------|---------------|--------------|-------------------------------|-----------|
| 1 | BALB\С +ГЕЛЬ | B-16 | + | 60 ДНЕЙ (срок наблюдения)* | - |
| 2 | BALB\С | B-16 | - | > СРОКА НАБЛЮДЕНИЯ | - |
| 3 | C57BLACK+ГЕЛЬ | SKMEL28 | + | > СРОКА НАБЛЮДЕНИЯ | - |
| 4 | C57BLACK | SKMEL28 | - | > СРОКА** НАБЛЮДЕНИЯ | - |

*-животные с выросшими в геле опухолями забиты. Выделенные из них опухолевые клетки использованы в следующем эксперименте (табл 2)

**-мыши использованы далее в опыте по оценке иммунитета против меланомы В-16 (табл 3)

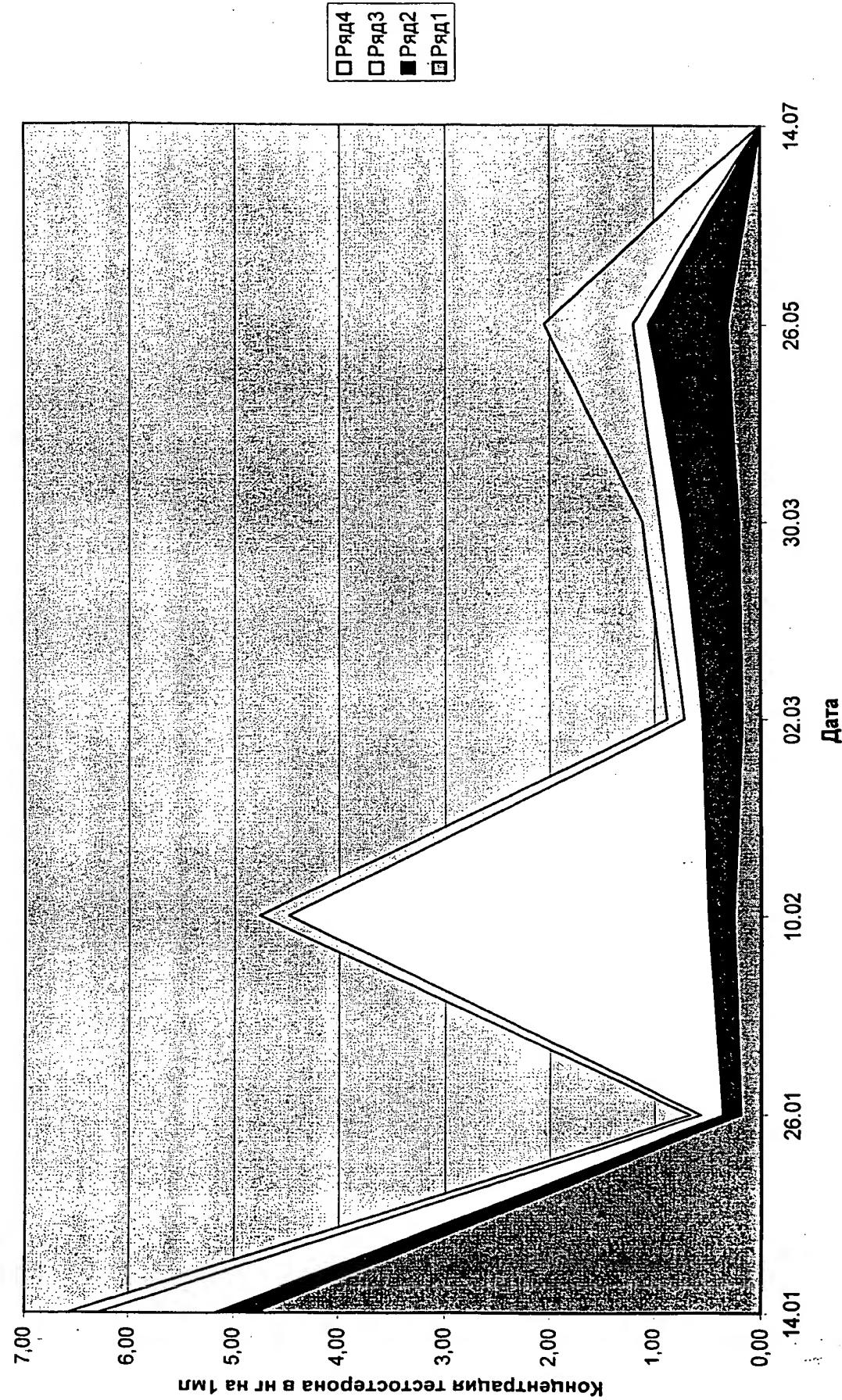
**ТАБЛИЦА 2. ТУМОРОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ МЕЛАНОМЫ В-16,
КУЛЬТИВИРОВАННОЙ В ГЕЛЕВОЙ КАПСУЛЕ, В МЫШАХ ЛИНИИ
BALB\С ПРИВИТОЙ МЫШАМ ЛИНИИ C57BLACK.**

| № | ШТАММ ОПУХОЛИ | ВРЕМЯ ПОЯВЛЕНИЯ ОПУХОЛИ | СРОК ЖИЗНИ МЫШЕЙ | НАЛИЧИЕ МЕТАСТАЗОВ |
|---|--|-------------------------|------------------|--------------------|
| 1 | Меланома из геля мышей линии BALB/C (B-16 - X) | 30 ДНЕЙ | 60 ДНЕЙ | + |
| 2 | B-16 (контроль) | 7 ДНЕЙ | 22 ДНЯ | + |

ТАБЛИЦА 3. ИММУНОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ SKMEL28 ДЛЯ МЫШЕЙ.

| № | ШТАММ ОПУХОЛИ | СРОК ПОЯВЛЕНИЯ ОПУХОЛИ | ГИБЕЛЬ ЖИВОТНЫХ |
|---|---------------|------------------------|-----------------|
| 5 | B-16 | — | > 60 ДНЕЙ |
| 6 | B-16 | 7-15 ДНЕЙ | 18-20 ДЕНЬ |

График 1



РЕФЕРАТ

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии и иммуноонкологии и касается проблемы вакцинации против опухолевых клеток и вакцинотерапии онкологических заболеваний. Поставленная задача решается за счет того, что в полиакриламидный гель (находящийся *in vivo*) вводят гетерогенные клетки млекопитающих, в том числе и опухолевые.

U 013571-6
097890496
JC18 Rec'd PCT/PTO 31 JUL 2001

RUSSIAN AGENCY FOR PATENTS
AND TRADEMARKS

FEDERAL INSTITUTE OF INDUSTRIAL PROPERTY (FIPS)

Registration No. 20/12-392

"25" June 2001

C E R T I F I C A T E

Federal Institute of Industrial Property of the Russian Agency For Patents and Trademarks certify hereby that the documents appended herewith represent a facsimile reproduction of the original Complete specification, claims and drawings (if any) of the Patent Application No. 99125349 filed on the **08th** day of the month of **December** in the year **1999** (08.12.1999).

Title of the Invention: Method of Cultivation and Modification of Heterogeneous Cells of Mammals

Applicant: ZYBIN Dmitry Vladimirovich
KOTELEVITS Alexei Gennadievich
SEVERIN Sergei Evgenievich
SOLOGUB Vladimir Konstantinovich

Actual Authors: ZYBIN Dmitry Vladimirovich
KOTELEVITS Alexei Gennadievich
SEVERIN Sergei Evgenievich
SOLOGUB Vladimir Konstantinovich

On behalf of the Agency A. L. Zhuravlev

Deputy Department
Manager

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**METHOD OF CULTIVATION AND MODIFICATION
OF HETEROGENEOUS CELLS OF MAMMALS**

A61K 35/12

The present invention relates to medicine, particularly to immunology and immunooncology, and is concerned with the problem of vaccination against tumor cells and of vaccino-therapy of oncological diseases.

It is known that the problem of transplanting organs, tissues, cell cultures of mammals involves difficulties associated with the possibility of xenogenous tissue-and-cell agents to "take root" in the recipients' organism. The existing methods of transplanting allo-, hetero- and xeno-transplants require either powerful immunosuppressive therapy of the recipient or original procedures. These latter comprise methods of transplanting cells of various organs of human and animal fetuses, i.e., the effect of undeveloped species specificity is employed. In such a manner, e.g., islet cell cultures of the pancreas of 24-26 weeks' human fetuses are transplanted into the parenchyma of the liver or into the portal vein in experiments with rats.

The place of introducing cells may be splenic pulp or muscles of the anterior abdominal wall. Cases of treating humans suffering from diabetes mellitus by a similar method

THIS PAGE BLANK (USP10)

are known (Skaletskii N.N., "The Effect of Cultivating Islet Cells of the Pancreas on Their Survival in the Organism of a Xenogenous Recipient", in: All-Russian Conference on Transplantation of Organs, 1995, pp. 219-220 (in Russian)).

The transplantation of Leydig's cells into testicular tissue to males for treating infertility is of interest, because the rejection reaction does not occur due to the presence of a hematotesticular barrier (Zybin D.V., "Method of Treating Patients with Dysfunction of Male Sexual Sphere by Transplantation Techniques", RF Patent 2026643 of 20.01.95).

As a result of both above-described methods, good results were obtained in preserving the viability and activity of transplanted cells. However, in the first case a definite disadvantage of the method is the use of only embryonal cells, while in the second case only male individuals are subjected to cell therapy.

There is known a method of vaccination and vaccinotherapy of tumors with the help of live cells. The employed cells are hybridomas or transfected cells, allogenic or autogenic. This method is disadvantageous in the short-time of the cells in the organism and, correspondingly, a low immunizing effect (B.E. Souberbielle, M. Westby, S. Ganz, and J. Kayaga, Comparison of four strategies for tumor vaccination in the B-16 F 10 melanoma model. Gene Therapy 1998, 1447-1454).

THIS PAGE BLANK (USPTO)



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ
(РОСПАТЕНТ)

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

рег.№ 20/12-392

"25" июня 2001 г.

С П Р А В К А

Федеральный институт промышленной собственности Российского агентства по патентам и товарным знакам настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы и чертежей (если имеются) заявки на выдачу патента на изобретение № 99125349, поданной в декабре месяце восьмого дня 1999 года (08.12.1999).

Название изобретения

Способ культивирования и модификации гетерогенных клеток млекопитающих

Заявитель

ЗЫБИН Дмитрий Владимирович
КОТЕЛЕВИЦ Алексей Геннадиевич
СЕВЕРИН Сергей Евгеньевич
СОЛОГУБ Владимир Константинович

Действительный автор(ы)

ЗЫБИН Дмитрий Владимирович
КОТЕЛЕВИЦ Алексей Геннадиевич
СЕВЕРИН Сергей Евгеньевич
СОЛОГУБ Владимир Константинович

Уполномоченный заверить копию
заявки на изобретение

А.Л. Журавлев
И.О. заведующего отделом

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The following methods are closest to the method of the present invention:

Transplantation of pancreatic islets (PIs) using micro-encapsulation.

The method consists in introducing (allo- or xenogenic) PIs encapsulated in spheres of an alginate gel. The spheres are implanted intraperitoneally. The implantation of spheres completely replaces insulin therapy during 175 days, but in this case immunosuppressive therapy is concurrently used. Bovine PIs are administered to rats with induced diabetes without immunosuppression. Normoglycemia is maintained from several weeks to one month.

The method is disadvantageous in the necessity of using immunosuppressive therapy. Furthermore, definite difficulties are involved in preparing capsules *in vitro* (Lanza R.P., Esker D.M., and Marsh J.P., Transplantation of islets using microencapsulation studies in diabetic rodents and dogs. *J. Mol. Med.*, 1999 Jan. 77(1): 206-10).

Also known is a method of vaccination and vaccinotherapy of tumors with the help of live cells. The procedure consists in producing hybridomas of tumor cells and allogenic dendritic cells (or macrophages). The obtained hybridomas are used as vaccine preparations.

A disadvantage of this method is a low immunizing effect, caused by the short-time existence of the introduced cells in the recipient's organism (Gajewsky T.F. and Fal-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

larino F., Rational development of tumor antigen-specific immunization in melanoma. Therapeutic Immunology, 1997, 2, 211-225).

The object of the present invention is to provide the possibility of long-term existence of heterogeneous cells in the recipient's organism with a modification of some of the cells, particularly tumor ones. Said object is accomplished by preliminary administration of a polyacrylamide gel to a mammal, followed by injecting heterogeneous cells of mammals into the resulting capsule.

The essence of the proposed method is as follows.

A connective-tissue capsule is formed by way of subcutaneous injection of a polyacrylamide gel (PAAG) to Vistar-line rats in the volume of 1.0 ml and to mice of C57BLACK and BALB/C lines the volume of 0.5 ml. Individuals of different sexes participate in the experiment. Leydig's cells of pubescent young pigs and rats are introduced into the gel. Animals to which cells are injected subcutaneously serve as control. A suspension of viable Leydig's cells from the testicles of pubescent young pigs and rats is prepared by using solutions containing a nutrient substrate for cells, in particular, compositions of standard Eagle's media, medium 199, Hanks' solution, etc.

The number of implanted cells is 5 million per ml. Blood samples of the animals are taken during 7 months for testosterone determination. In this part of the experiment

THIS PAGE BLANK (USPTO)

female rats are used (Plot 1), this being indicative of a high activity of the intracapsular transplant. After 7 months of observations the animals are sacrificed and a histological investigation is carried out, which indicates the presence of a large amount of viable Leydig's cells, so that a conclusion can be drawn about the possibility of vital activity of xeno- and heterogeneous cells in the recipient's organism with the use of a gel.

The following Examples illustrate the vital activity and the immunogenic activity of tumor cells in vivo in the gel.

Example 1: PAAG in the volume of 0.5 ml is administered subcutaneously to an experimental group of mice of the BALB/C line (6 individuals). Tumor cells of murine melanoma B-16 are injected into the gel in the volume of 1 ml with the concentration of cells of 1 million cells per ml.

Cells of murine melanoma B-16 in the volume of 1 ml with the concentration of cells of 1 million per ml are administered subcutaneously to a control group of mice of the BALB/C line (6 individuals).

It is known that in mice of the BALB/C line the tumor of murine melanoma B-16 does not grow. In the control group of the animals the tumor growth was found in none of the 6 individuals. In the experimental group of the animals, by way of palpitory examination, a growth of tumor in the PAAG was noted in all the 6 individuals. By the 60th day the ex-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

perimental animals with the murine melanoma B-16 in the gel are sacrificed. The gel with tumor cells is extracted under aseptic conditions and transferred to a monolayer culture on the nutrient medium RPMI-1640 with 10% fetal serum. Fragments of the capsule with the tumor cells are fixed in a neutral solution of formalin, and a histological investigation is carried out, which allows one to judge about a higher differentiation of melanoma cells and the loss of the proliferative activity by them (Table 1 [1-2]).

Example 2: A culture of cells prepared as in Example 1 is administered subcutaneously in the amount of 1 ml with the concentration of cells of 1 million to mice of the C57BLACK line (6 individuals).

It is known that in mice of the C57BLACK line the tumor of murine melanoma B-16 grows in 100% of cases, death of the animals occurs on the 20-25th day in 100% of cases.

To the control group of C57BACK mice a culture of cells of murine melanoma B-16 is administered in the amount of 1 ml with the concentration of cells of 1 million.

In experimental mice the appearance of symptoms of tumor growth is noted in 60-65 days; in control mice, in 20-23 days (Table 2).

Example 3: PAAG in the volume of 0.5 ml is injected subcutaneously to mice of the C57BLACK line (6 individuals). A cell culture of human melanoma SKMEL is injected into the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gel in the amount of 1 ml with the concentration of cells of 1 million.

The control group of mice of the same line (6 individuals) is administered subcutaneously a cell culture of human melanoma SKMEL28 in the volume of 1 ml with the concentration of cells of 1 million.

It is known that the cell culture of human melanoma does not grow in mice in 100% of cases. In the experimental group of animals the tumor growth in the gel is determined by palpation on the 15-20th day after the injection. In the control animals no tumor growth is found (Table 1 [3-4]).

Example 4: The group of experimental animals (6 individuals), described in Example 3, is administered subcutaneously a cell culture of murine melanoma B-16 in the volume of 1 ml with the concentration of cells of 1 million. The control group of mice of the C57BLACK line (6 individuals) is administered subcutaneously a cell culture of murine melanoma B-16 in the volume of 1 ml with the concentration of cells of 1 million.

In the control animals subcutaneous melanomas approximately 3-5 cm in diameter develop on the 7-15th day. In the experimental animals no symptoms of tumor are detected during the same period of time (Table 3).

Conclusion: the obtained results make it possible to propose a method of cultivating heterogeneous cells in PAAG *in vivo*, whereby the proliferative activity of tumor cells

THIS PAGE BLANK (USPTO)

is lowered, and the cultivated cells produce an immunizing effect on the organism, this being useful for vaccination and vaccinotherapy.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CLAIMS

A method of cultivation and modification of heterogeneous cells of mammals and subsequent use thereof for preparing vaccine preparations, characterized in that the cultivation of heterogeneous cells is carried out in a polyacrylamide gel for a long time in a living organism.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TABLE 1. COMPARISON OF THE GROWTH OF MELANOMAS B-16 (MURINE) AND SKMEL 28 (HUMAN) IN MICE OF BALB/C AND C57BLACK LINES

| | LINE OF MICE | TUMOR STRAIN | GROWTH OF MELANOMA | SPAN OF LIFE | META-STASES |
|--|----------------|--------------|--------------------|--|-------------|
| | BALB/C + GEL | B-16 | + | 60 DAYS (observa- tion pe- riod)* | - |
| | BALB/C | B-16 | - | > OB- SERVA- TION PE- RIOD | - |
| | C57BLACK + GEL | SKMEL28 | + | > OB- SERVA- TION PE- RIOD | - |
| | C57BLACK | SKMEL28 | - | > OB- SERVA- TION PE- RIOD** | - |

* Animals with tumors grown in the gel are sacrificed.

The tumor cells isolated from them are used in the next experiment (Table 2).

** Mice are used further in the experiment for estimating immunity against melanoma B-16 (Table 3).

TABLE 2. TUMORIGENIC ACTIVITY OF MELANOMA B-16, CULTIVATED IN A GEL CAPSULE, IN MICE OF BALB/C LINE, GRAFTED TO MICE OF C57BLACK LINE

| NO. | TUMOR STRAIN | TIME OF TU- MOR APPEAR- ANCE | LIFE-SPAN OF MICE | PRESENCE OF METASTASES |
|-----|---|------------------------------------|----------------------|---------------------------|
| 1 | Melanoma from gel of mice of BALB/C line (B-16-X) | 30 DAYS | 60 DAYS | + |
| 2 | B-16 (control) | 7 DAYS | 22 DAYS | + |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**TABLE 3. IMMUNOGENIC ACTIVITY OF HUMAN MELANOMA SKMEL28
FOR MICE**

| NO. | TUMOR STRAIN | TUMOR APPEARANCE TIME | DEATH OF ANIMALS |
|-----|--------------|-----------------------|------------------|
| 5 | B-16 | - | > 60 DAYS |
| 6 | B-16 | 7-15 DAYS | 18-20 DAYS |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ABSTRACT

The invention relates to medicine and more particularly to immunology and immunooncology and is concerned the problem of vaccination against tumor cells and vaccinotherapy of oncological diseases. The posed problem is solved by that heterogeneous cells of mammals, including tumor cells, are introduced into a polyacrylamide gel (which is *in vivo*).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И МОДИФИКАЦИИ ГЕТЕРОГЕННЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А61К 35/12

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии и иммуноонкологии и касается проблемы вакцинации против опухолевых клеток и вакцинотерапии онкологических заболеваний.

Известно, что проблема трансплантации органов, тканей, клеточных культур млекопитающих сопряжена с трудностями связанными с «приживляемостью» чужеродных тканево-клеточных агентов в организме реципиента. Существующие способы пересадки алло-, гетеро-, ксенотрансплантантов требуют или мощной иммуносупрессивной терапии реципиента или оригинальных методик. К последним относятся способы трансплантации клеток различных органов плодов человека и животных, т.е. используется эффект несложившейся видовой специфичности. Таким образом проводят трансплантацию культур островковых клеток поджелудочной железы 24-26 недельных плодов человека в паренхиму печени или в воротную вену в эксперименте крысам.

Местом введения клеток может служить пульпа селезенки или мышцы передней брюшной стенки. Известны случаи лечения аналогичным методом людей, страдающих сахарным диабетом. (Скалецкий Н.М. «Влияние культивирования островковых клеток поджелудочной железы на их выживание в организме ксеногенного реципиента». Всесоюзная конференция по трансплантации органов 1995 г., стр. 219-220.)

Представляет интерес пересадка клеток Лейдига в тестикулярную ткань мужским особям для лечения бесплодия, так как реакция отторжения не наступает из-за наличия гематотестикулярного барьера. (Зыбин Д.В. «Способ лечения больных с нарушением мужской половой функции методом трансплантации». Патент РФ № 2026643 от 20.01.95.)

Засекречено до 20.11.01

22.03.2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

В результате обоих описанных способов были получены хорошие результаты по сохранению жизнеспособности и активности трансплантируемых клеток. Но в первом случае определенным недостатком способа можно считать использование только эмбриональных клеток, а во втором - клеточной терапии подвергаются только мужские особи.

Известен способ вакцинации и вакцинотерапии опухолей с помощью живых клеток. Применяемые клетки являются гибридомами или трансфенированными клетками, аллогенными или аутогенными. Недостатками являются кратковременное существование клеток в организме и соответственно низкий иммунизирующий эффект. (B.E. Souberbielle, M.Westby, S.Ganz, J.Kayaga. Comparison of four strategies for tumor vaccination in the B-16 F10 melanoma model. Gene therapy 1998, 1447-1454.)

Наиболее близкими, предложенному способу, являются следующие способы:

Трансплантация ОКПЖ (островковых клеток поджелудочной железы) с использованием микрокапсулляции.

Способ состоит в введении ОКПЖ (алло- или ксеногенных), инкапсулированных в сферы альгинатного геля. Сферы имплантируют интраперитониально. Имплантация сфер полностью заменяет терапию инсулином на 175 дней, но при этом одновременно применяется иммуносупрессивная терапия. Крысам с индуцированным диабетом вводят бычью ОКПЖ без иммуносупрессии. Нормогликемия поддерживается от нескольких недель до месяца.

Недостатком способа является необходимость применения иммуносупрессивной терапии, кроме того определенные трудности представляет приготовление капсул *in vitro*. (Lanza R.P., Ecker D.M., Marsh J.P. Transplantation of islets using microencapsulation: studies in diabetic rodents and dogs. J.Mol.Med. 1999 Jan. 77(1): 206-10).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Известен способ вакцинации и вакцинотерапии опухолей с помощью живых клеток. Методика состоит в получении гибридом опухолевых клеток и аллогенных дендритных клеток (или макрофагов). Полученные гибридомы используют как вакцинныепре препараты.

Недостатком является невысокий иммунизирующий эффект, обусловленный кратковременным существованием введенных клеток в организм реципиента. (Gajewski T.F., Fallarino F. Rational development of tumor antigen-specific immunization in melanoma. Therapeutic Immunology, 1997, 2, 211-225).

Целью изобретения является обеспечение возможности длительного существования гетерогенных клеток в организме реципиента с модификацией некоторых из них, в частности опухолевых. Поставленная цель достигается путем предварительного введения млекопитающему поликариламидного геля, с последующей инъекцией в образовавшуюся капсулу гетерогенных клеток млекопитающих.

Сущность предложенного способа состоит в следующем.

Соединительнотканная капсула формируется путем подкожного введения поликариламидного геля (ПААГ) крысам линии Wister в объеме 1,0 мл и мышам линии C57BLACK и BALB\С в объеме 0,5 мл. В эксперименте участвуют разнополые особи. В гель вводят клетки Лейдига половозрелых поросят и крыс. Контролем служат животные, которым вводят клетки под кожу. Суспензию жизнеспособных клеток Лейдига тестикул половозрелых поросят и крыс готовят, используя растворы, содержащие питательный субстрат для клеток, в частности составами стандартных сред Игла , среды 199, раствором Хэнкса и т.п.

Количество имплантируемых клеток составляет 5млн. кл в 1мл. В течение 7 месяцев берут пробы крови животных с целью определения тестостерона. Причем, в этой части эксперимента используют самок крыс /график 1/, что говорит о высокой активности внутрикапсуллярного

3 ассессы

Д осн 22.03.20

счет

THIS PAGE BLANK (USPTO)

трансплантата. После 7 месяцев наблюдения животных забивают и проводят гистологическое исследование, которое показывает наличие большого количества жизнеспособных клеток Лейдига, что позволяет сделать вывод о возможности жизнедеятельности ксено- и гетерогенных клеток в организме реципиента с использованием геля.

Следующие примеры иллюстрируют жизнедеятельность и иммуногенную активность опухолевых клеток *in vivo* в геле.

Пример 1: Опытной партии мышей линии BALB\С (в количестве 6 особей), подкожно вводят ПААГ в объеме 0,5 мл. В гель вводят клетки опухоли меланомы мыши В-16 в объеме 1 мл с концентрацией клеток 1 млн.

Контрольной группе мышам линии BALB\С (в количестве 6 особей) подкожно вводят клетки меланомы мыши В-16 в объеме 1 мл. с концентрацией клеток 1 млн.

Известно что, у мышей линии BALB\С меланома мышей В-16 не дают роста. В контрольной группе животных рост опухоли не обнаружен у всех 6 особей. В опытной группе животных, путем пальпаторного исследования, отмечен рост опухоли в ПААГ у всех 6 особей. На 60 день опытных животных с мышной меланомой В-16 в геле забивают. Гель с опухолевыми клетками извлекают в асептических условиях и переводят в монослойную культуру на питательной среде РПМИ-1640 с 10% фетальной сывороткой. Фрагменты капсулы с опухолевыми клетками фиксируют в нейтральном растворе формалина и проводят гистологическое исследование, которое позволяет судить о более высокой дифферинизации меланомных клеток и потере ими пролиферативной активности (табл. 1 [1-2]).

Пример 2: Культуру клеток, полученную по примеру 1, в количестве 1мл с концентрацией клеток 1 млн. вводят мышам линии C57 BLACK подкожно (количество особей 6).

запись
дата 22.03.2000
секр

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Известно, что опухоль меланомы мышей B-16 у линии мышей C57 BLACK дает рост опухоли в 100% случаев, гибель животных наступает на 20-25 день в 100% случаев.

Контрольной группе мышей C57BLACK вводят культуру клеток меланомы мыши B-16 в количестве 1 мл с концентрацией клеток 1 млн.

У опытных мышей появление признаков роста опухоли отмечают через 30-33 дня, в контроле через 5-8 дней. Срок жизни опытных мышей составляет 60-65 дней, контрольных – 20-23 дня (табл. 2).

Пример 3: Мышам линии C57black (в количестве 6 особей) вводят ПААГ в объеме 0,5 мл подкожно. В гель вводят культуру клеток меланомы человека SKMEL28 в объеме 1 мл с концентрацией клеток 1 млн.

Контрольной группе мышей, той же линии, (в количестве 6 особей) вводят подкожно культуру клеток меланомы человека SKMEL28 в объеме 1 мл с концентрацией клеток 1 млн.

Известно что, культура клеток меланомы человека не дает роста у мышей в 100% случаев. В опытной группе животных в геле определяется пальпированием рост опухоли на 15-20 день после инъекции. У контрольных животных рост опухоли не отмечен (таблица 1 [3-4]).

Пример 4: Группе опытных животных (количество особей 6), описанных в примере 3, вводят культуру клеток меланомы мыши B-16 подкожно в объеме 1 мл с концентрацией клеток 1 млн. Контрольной группе мышей линии C57BLACK (количество особей 6) вводят подкожно культуру клеток меланомы мыши B-16 в объеме 1 мл с концентрацией клеток 1 млн.

У контрольных животных на 7-15 день развиваются подкожные меланомы в диаметре приблизительно 3-5 см.. В это же время у опытных мышей признаков опухоли не обнаружено (табл.3).

Вывод: таким образом, полученные результаты позволяют предложить способ культивирования гетерогенных клеток *in vivo*

засекрено
докт 22. 03. 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

в результате чего снижается пролиферативная активность опухолевых клеток и культивируемые клетки оказывают на организм иммунизирующее действие, что может быть использовано для вакцинации и вакцинотерапии.

Занесено 22.08.2000
чел

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ культивирования и модификации гетерогенных клеток млекопитающих, с последующим использованием их для получения вакцины препаратов, отличающийся тем, что культивирование гетерогенных клеток осуществляется в полиакриламидном геле длительное время в живом организме.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ТАБЛИЦА № 1. СРАВНЕНИЕ РОСТА МЕЛАНОМЫ В-16 (МЫШЕЙ) И SKMEL 28 (ЧЕЛОВЕКА) В МЫШАХ ЛИНИЙ BALB\С И C57BLACK.

| № | ЛИНИЯ МЫШЕЙ | ШТАММ ОПУХОЛИ | РОСТ МЕЛАНОМЫ | ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ | МЕТАСТАЗЫ |
|---|---------------|---------------|---------------|-------------------------------|-----------|
| 1 | BALB\С +ГЕЛЬ | B-16 | + | 60 ДНЕЙ (срок наблюдения)* | - |
| 2 | BALB\С | B-16 | - | > СРОКА НАБЛЮДЕНИЯ | - |
| 3 | C57BLACK+ГЕЛЬ | SKMEL28 | + | > СРОКА НАБЛЮДЕНИЯ | - |
| 4 | C57BLACK | SKMEL28 | - | > СРОКА** НАБЛЮДЕНИЯ | - |

*-животные с выросшими в геле опухолями забиты. Выделенные из них опухолевые клетки использованы в следующем эксперименте (табл 2)

**-мыши использованы далее в опыте по оценке иммунитета против меланомы В-16 (табл 3)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ТАБЛИЦА 2. ТУМОРОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ МЕЛАНОМЫ В-16,
КУЛЬТИВИРОВАННОЙ В ГЕЛЕВОЙ КАПСУЛЕ, В МЫШАХ ЛИНИИ
BALB/C ПРИВИТОЙ МЫШАМ ЛИНИИ C57BLACK.

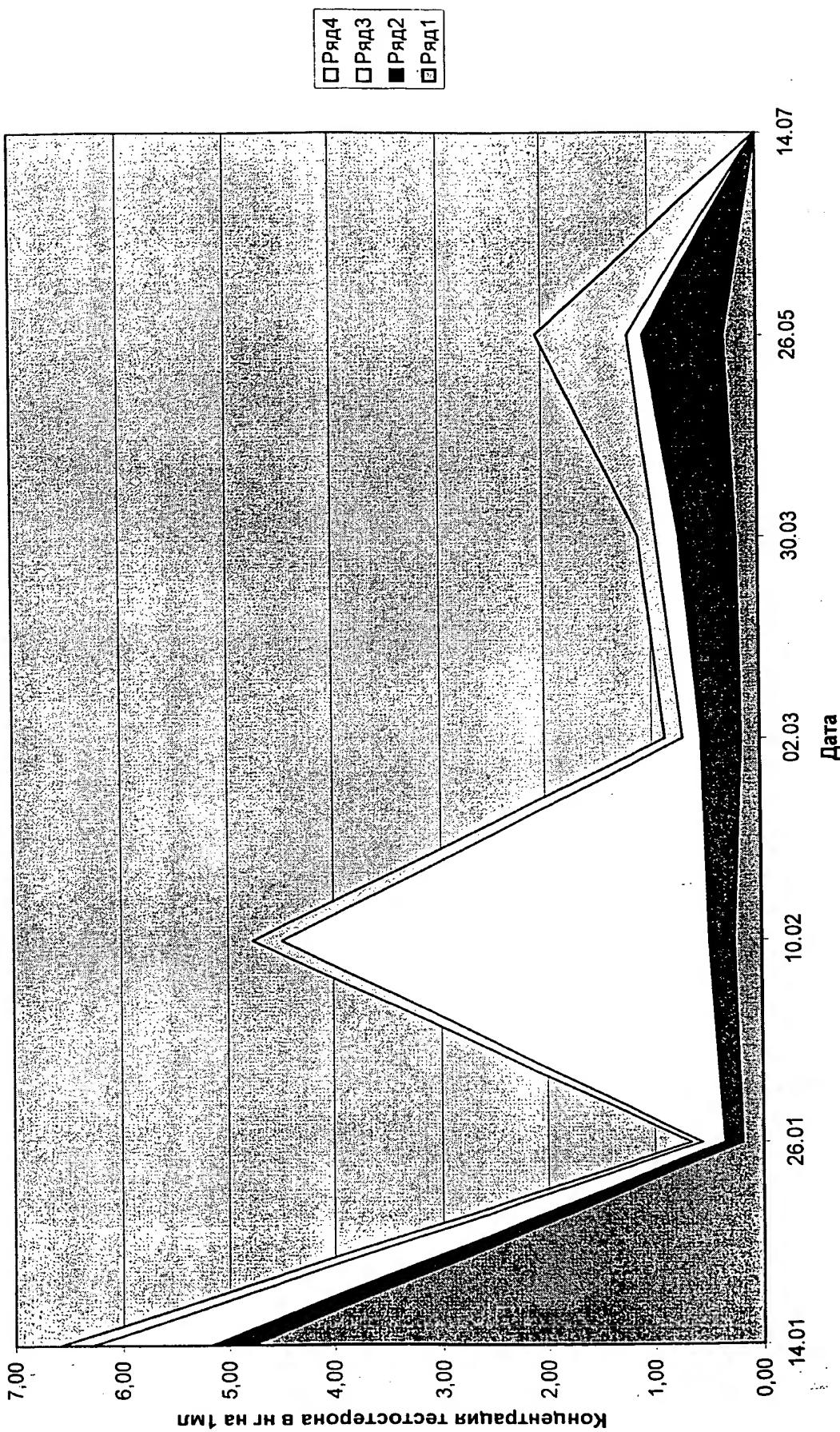
| № | ШТАММ ОПУХОЛИ | ВРЕМЯ ПОЯВЛЕНИЯ ОПУХОЛИ | СРОК ЖИЗНИ МЫШЕЙ | НАЛИЧИЕ МЕТАСТАЗОВ |
|---|--|-------------------------|------------------|--------------------|
| 1 | Меланома из геля мышей линии BALB/C (B-16 - X) | 30 ДНЕЙ | 60 ДНЕЙ | + |
| 2 | B-16 (контроль) | 7 ДНЕЙ | 22 ДНЯ | + |

ТАБЛИЦА 3. ИММУНОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ SKMEL28 ДЛЯ МЫШЕЙ.

| № | ШТАММ ОПУХОЛИ | СРОК ПОЯВЛЕНИЯ ОПУХОЛИ | ГИБЕЛЬ ЖИВОТНЫХ |
|---|---------------|------------------------|-----------------|
| 5 | B-16 | — | > 60 ДНЕЙ |
| 6 | B-16 | 7-15 ДНЕЙ | 18-20 ДЕНЬ |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

График 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Р Е Ф Е Р А Т

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии и иммуноонкологии и касается проблемы вакцинации против опухолевых клеток и вакцинотерапии онкологических заболеваний. Поставленная задача решается за счет того, что в поликариламидный гель (находящийся *in vivo*) вводят гетерогенные клетки млекопитающих, в том числе и опухолевые.

THIS PAGE BLANK (USPTO)